



“A Day with André Gratia – Without Knowing It”

How a Pioneer at ULB Still Shapes Modern Bacteriology

Pr. Anne Botteaux
ULB- European Plotkin Institute for Vaccinology



ACTION FIBRINOLYTIQUE DU STAPHYLOCOQUE

PAR

ANDRÉ GRATIA

COAGULASE TEST



(Laboratoire de Physiologie de l'Université libre de Bruxelles.)

A PROPOS DE LA COAGULATION DU PLASMA OXALATÉ PAR LE STAPHYLOCOQUE.
(TRANSFORMATION DU PROSÉROZYME EN SÉROZYME.)

Note d'ANDRÉ GRATIA, présentée par M. J. BORDET.

Nous savons que la coagulation du sang est le résultat de la transformation du fibrinogène en fibrine sous l'action de la thrombine. Mais celle-ci provient elle-même d'après Bordet et Delange de la réaction en présence de sels de calcium, de deux produits, le *cytozyme* qui existe dans les cellules (et surtout dans les plaquettes, et le *sérozyme* dont on retrouve l'excédent dans le sérum après la coagulation. Le plasma ne renferme pas le *sérozyme* à l'état actif: il ne possède pas, comme le sérum, la propriété de réagir très promptement avec le *cytozyme*. Pour que la coagulation s'opère, il faut donc que le *cytozyme* sorte des plaquettes et que, de plus, le *sérozyme* se forme aux dépens de la substance mère, le *prosérozyme*.

On sait, d'ailleurs, depuis longtemps que le plasma oxalaté est incoagulable parce qu'il est privé des sels de calcium indispensables à la formation de la thrombine. Il se coagule donc si on lui restitue son calcium ou si on l'additionne de thrombine toute formée. Le staphylocoque ensemencé dans du plasma oxalaté a également la propriété de le faire coaguler.

I. — Il ressort de l'expérience suivante que le staphylocoque solidifie le fibrinogène sans intervention des autres agents de la coagulation, *cytozyme* ou *sérozyme*. Si on prive complètement un plasma de ses





Preliminary report on a staphylococcus bacteriophage.

By ANDRÉ GRATIA.

[From the Laboratories of the Rockefeller Institute for Medical Research.]



In 1915, two years before the discovery of d'Hérelle, Twort described the following phenomenon.² If glycerinated calf vaccinia is streaked on agar slants, a certain number of the micrococcus colonies which grow become glassy and transparent, and degenerate into a granular material which cannot be subcultured and which, even when diluted 1,000,000 times and filtered, gives rise to the same degeneration when added to a normal culture of micrococci, and so on indefinitely.

¹ Sollmann, T., and Pilcher, J. D., *Jour. Pharm. and Exp. Ther.*, 1919, ix, 309.

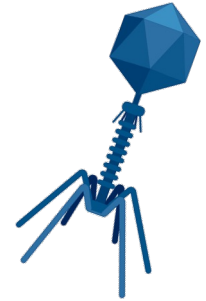
² *The Lancet*, 1915, ii, 1241.



10.00 Lab meeting and problem solving



Jules Bordet, ULB



697

BRUXELLES-MÉDICAL

Mais lorsque cet état est la résultante, à la fois d'une lésion consécutive à l'accident et d'un état antérieur qui vient aggraver celle-ci, l'indemnité est réduite en proportion. Ne serait-il pas juste de procéder de la même manière à l'égard de la sinistrose ? Il arrive très fréquemment que l'expert déclare que l'incapacité de travail d'un accidenté résulte en partie d'un mal réel, objectivement constatable, attribuable à l'accident, mais que cette incapacité est aggravée du fait que la victime est en proie à un état de névrose de revendication qui augmente ses prétentions. Ces cas-là sont, à mon avis, les plus fréquents, car les cas de sinistrose pure sont plus rares. Il n'y a aucune raison valable de ne pas déduire de l'indemnisation, ce qui n'a pas de rapport direct de causalité avec l'accident, ce qui dépend de l'état mental particulier de l'assuré. En procédant ainsi, on parviendra, il faut l'espérer, à opposer une digue à la progression constante de la sinistrose, d'une maladie ou d'un état mental qui ne peuvent qu'avoir des effets funestes sur l'économie sociale d'une population.

BRUXELLES-MÉDICAL

DCCCXI IV

APPLICATION DU PROPIDON A LA BACTÉRIOTHÉRAPIE LOCALE

BOUILLON STOCK VACCIN MIXTE DU PROFESSEUR DELBET

PROPIDON

PANSEMENT

PANSEMENT TOUT PRÉPARÉ POUR EMPLOI LOCAL DU PROPIDON (Nécessaire contenant 2 Ampoules de PROPIDON de 10^{cc} & 2 compresses stériles.)

PROPIDEX

POMMADE A BASE DE PROPIDON EN TUBE ETAIN DE 30 gr.

Le Propidon-Pansement et le Propidex sont indiqués dans tous les cas où il y a lieu d'éviter la suppuration ou de la combattre si elle est déjà installée.

IIIIII

SOCIÉTÉ PARISIENNE D'EXPANSION CHIMIQUE

Mise au point de quelques notions de bactériophagie^(*)

par le Docteur André GRATIA,
Agrégé, Chef de travaux de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Bruxelles.

La méconnaissance de certaines notions de bactériophagie peut porter le clinicien à faire du bactériophage un usage injustifié risquant de compromettre le crédit d'une méthode qui, appliquée à bon escient, donne les plus remarquables résultats.

Le Bactériophage tend à entrer de plus en plus dans la pratique médicale, malheureusement certaines notions ont été faussées et ce n'est pas sans inquiétude que l'on voit une méthode très utile lorsqu'elle est employée judicieusement, risquer le discrédit par un usage abusif et injustifié.

Cela ne peut aboutir qu'à des échecs sur l'inconvénient desquels MM. Sauvé et Jacquemaire (1) ont récemment attiré l'attention. Aussi je crois devoir remettre au point quelques notions relatives à la bactériophagie.

Tout d'abord qu'est-ce que le Bactériophage ? C'est là une question qui touche au fondement même de la vie et comme le débat auquel se livrent les biologistes à ce sujet est encore loin d'être terminé, je n'en parlerai pas ici. Voici par contre en deux mots quelles en sont les manifestations.

En 1917, d'Hérelle observa que les selles d'individus convalescents de dysenterie contenaient une substance filtrable capable de dissoudre de jeunes cultures en bouillon de bacilles de Shiga et que quelques gouttes d'une culture ainsi dissoute pouvaient à leur tour reproduire le même phénomène dans une nouvelle culture de bacilles dysentériques, et ainsi

11. 30 Time to read



OPEN ACCESS

EDITED BY
Grégory Resch,
Centre Hospitalier Universitaire
Vaudois (CHUV), Switzerland

REVIEWED BY
Sahar Melamed,
Hebrew University of Jerusalem, Israel

*CORRESPONDENCE
Olivier Vandenberg
olivier.vandenberg@lhuv-uh.be

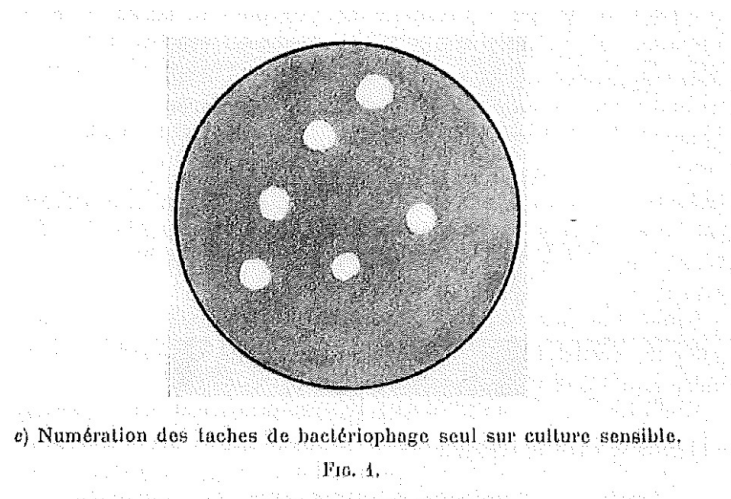
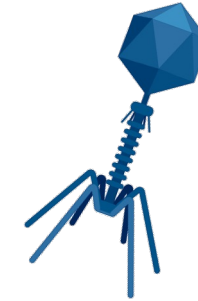
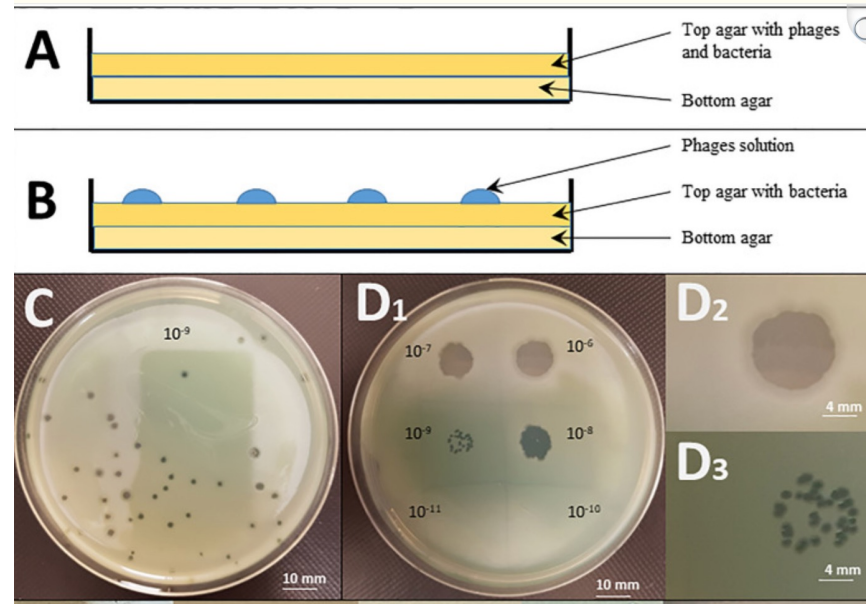
†These authors have contributed
equally to this work and share
senior authorship

Determination of phage susceptibility as a clinical diagnostic tool: A routine perspective

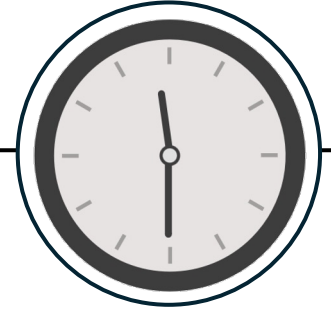
Valéry Daubie^{1,2}, Houssein Chalhoub^{1,3}, Bob Blasdel⁴,
Hafid Dahma², Maya Merabishvili⁵, Tea Glonti⁵,
Nathalie De Vos⁶, Johan Quintens⁴, Jean-Paul Pirnay⁵,
Marie Hallin^{3†} and Olivier Vandenberg^{1,3,7*†}

Double agar overlay plaque assay

Originally developed by André Gratia (Gratia, 2000) and formalized by Mark Hancock Adams (Adams, 1959), the double agar overlay plaque assay is a quantitative method on solid medium where a densely growing culture of bacteria is exposed to multiple phage dilutions, using one Petri dish per phage dilution. The relative phage to bacteria concentration is known as multiplicity of infection (MOI) input. Phage preparations are mixed with the bacterial strain in a molten 0.6% agar matrix and dispersed evenly onto solid 1.5% agar medium (Kropinski et al., 2009) (Figure 1B). If the phage is capable of propagating on the bacterial strain, the replication-lysis-infection cycle of the phage starts and propagates, being constrained to the surrounding agar gel area. After overnight incubation, the host bacterium forms a lawn on the solid medium, except where infectious phage particles have lysed bacterial cells, propagating outward from an infectious center. This forms what is known as a “plaque”, a zone without bacterial growth caused by the propagation of one phage particle.



11.30 Time to read



Bench



Basic research

Bedside



Clinical research

Translational
research

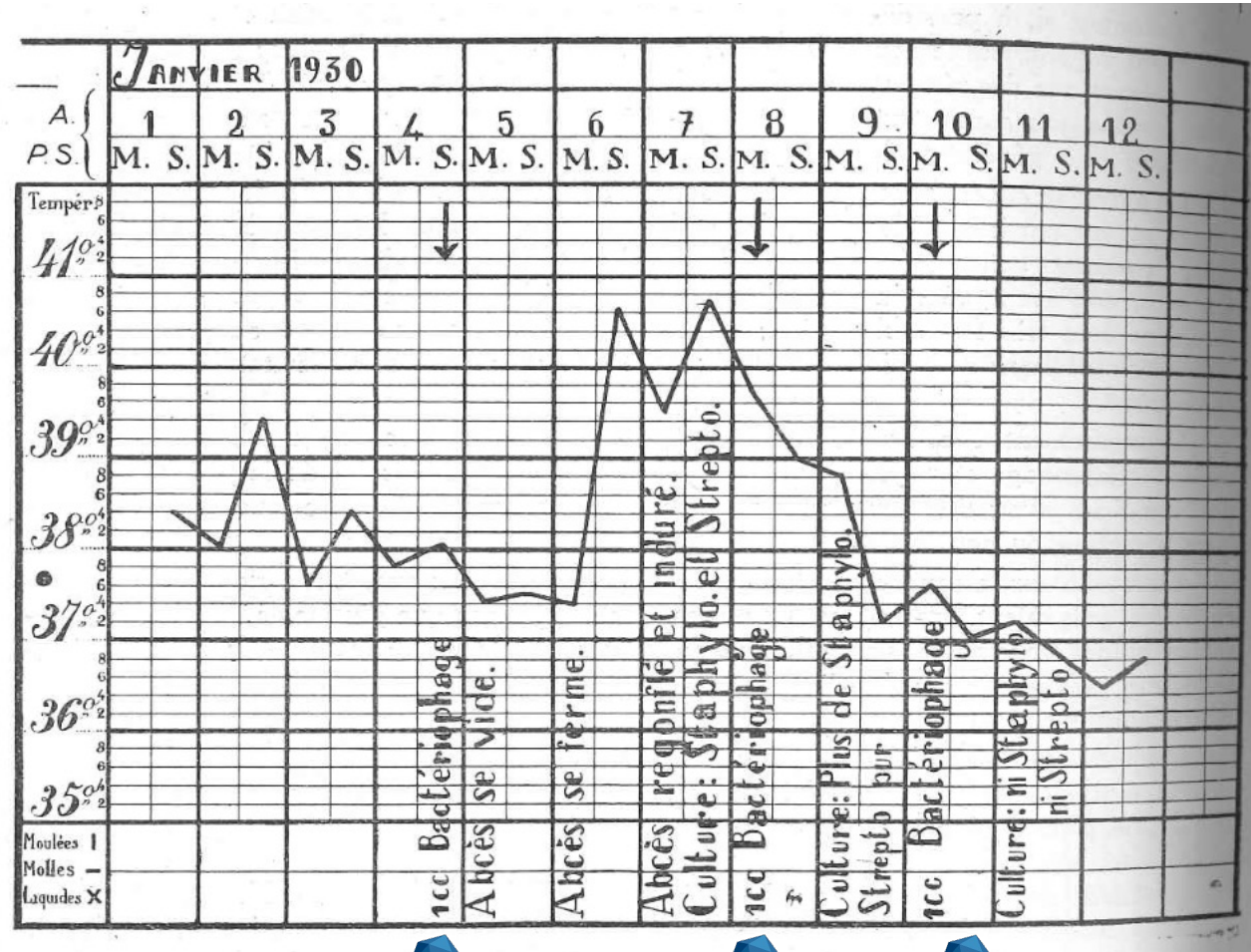
2. — La dissolution des bactéries et ses applications thérapeutiques par M. A. GRATIA, Correspondant.

Il y a douze ans j'ai eu l'honneur de voir présenter ici mon premier mémoire sur l'application thérapeutique du bactériophage du Staphylocoque (1). En vérité ce mémoire avait été précédé d'une note préliminaire à la Société de Biologie (2), laquelle avait été elle-même précédée de peu d'une note de M. Bruynoghe (3) sur le même sujet.

Je crois superflu de rappeler les circonstances qui m'avaient amené, en 1921, à trouver le bactériophage du Staphylocoque et les conséquences théoriques qui suivirent; je me contenterai de répéter les conclusions pratiques de mon mémoire de février 1922 et que voici :

« Des cinquante cas environ que nous avons étudiés jusqu'à présent, nous croyons pouvoir déduire que l'injection telle que nous l'avons pratiquée est inoffensive. Elle exerce sur l'évolution des folliculites, des furoncles, des anthrax, des abcès sous-cutanés des effets incontestablement favorables. A la réaction locale congestive d'une durée de vingt-quatre heures, succède une atténuation très marquée de la douleur et une disparition rapide de l'érythème qui, avant de s'évanouir, prend une teinte bleutée. On constate aussi le ramollissement précoce de l'induration et la résorption de l'œdème, très souvent, les bourbillons, les masses purulentes subissent une fluidification rapide et s'écoulent avec facilité par un orifice étroit ou même parfois se résorbent sur place peu à peu sans laisser de cicatrice. »

Early Translational Research



14.00 Paper writing



Anthraxis bacillus



Penicillium

court if he found just one larva; when spraying was incessant; and when students, soldiers, and policemen were punished for getting malaria because it was discovered that holes in their mosquito-net had not been mended. But then came independence, and the Ghanaian African became independent of the town council man. I suspect that WHO head Gro Harlem Brundtland would sooner provide funds to buttress a public-health approach than a drug-importing approach. Success of public health requires firm government, and not necessarily western-style democracy (*vide* China and the snails of schistosomiasis). But would averting a malaria disaster not upset the population control lobby?

Felix I D Konotey-Ahulu

Cromwell Hospital, London SW5 0TU, UK
(e-mail: konotey-ahulu@cromwell-hospital.co.uk)

- 1 White NJ, Nosten F, Looareesuwan S, et al. Averting a malaria disaster. *Lancet* 1999; 353: 1965–67.
- 2 Konotey-Ahulu FID. Fever in Africa and WHO recommendation. *Lancet* 1997; 350: 1549.
- 3 Kokwaro GO. Use of artemisinin (Qinghaosu) derivatives in the treatment of malaria. *Afr J Health Sci* 1998; 5: 8–11.
- 4 Wolffers I, Adjei S, van der Drift. Health research in the tropics. *Lancet* 1998; 351: 1652–54.

Nobel chronicle: Fleming and Gratia

Sir—Tonse Raju's March 13 Nobel Chronicle (p 936)¹ examines the work of Alexander Fleming, Ernst Boris Chain, and Howard Walter Florey. The work of Fleming and André Gratia on the bacteriolysis is also important. The two men knew each other well and took part in high-level scientific meetings on this subject

furunculosis. Gratia may well have been the first to observe bacteriolytic effects of various types of penicillium.

By coincidence, 3 years later, Fleming made the same observation with *P notatum*. This observation was later developed by Florey and Chain and led to an important advance in medicine.

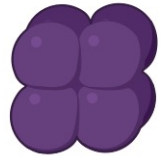
When Fleming received his Doctor Honoris Causa from the University of Liège in 1945, it was Gratia who had written and presented the opening speech for the diploma. During the next year, Fleming was interviewed for the Belgian radio and his text was also published. Here is what Fleming says in this text: "I cannot refrain from mentioning one other Belgian bacteriologist my good friend André Gratia, and I mention him for the special reason that, but for circumstance, he might well have been the discoverer of Penicillin. In 1926 he noticed that a mould apparently destroy and dissolve certain bacteria . . . The mould which he had might have been *Penicillium notatum* and the active substance might have been penicillin but as the culture was not preserved we shall never know."⁵

Gratia's mentor, Bordet, would probably have told him: "My boy, the problem with you is that you do not baptize your children!"

*C de Scoville, C De Brouwer, M Dujardin
Laboratoire de Santé au Travail, Public Health School, Free University of Brussels, B-1070 Brussels, Belgium

- 1 Raju TNK. The Nobel Chronicles. *Lancet* 1999; 353: 936.
- 2 Gratia A, Dath S. Propriété bactériolytiques de certaines moisissures. *C R Soc Biol* 1924; 91: 1442.
- 3 Gratia A, Dath S. De l'action bactériolytique des streptothrix. *C R Soc Biol* 1925; 92: 1125.
- 4 Gratia A, Dath S. Moisissures et microbes bactériophages. *C R Soc Biol* 1925; 92: 461.

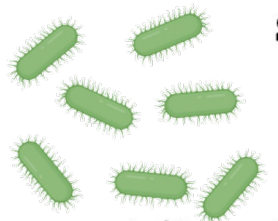




ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

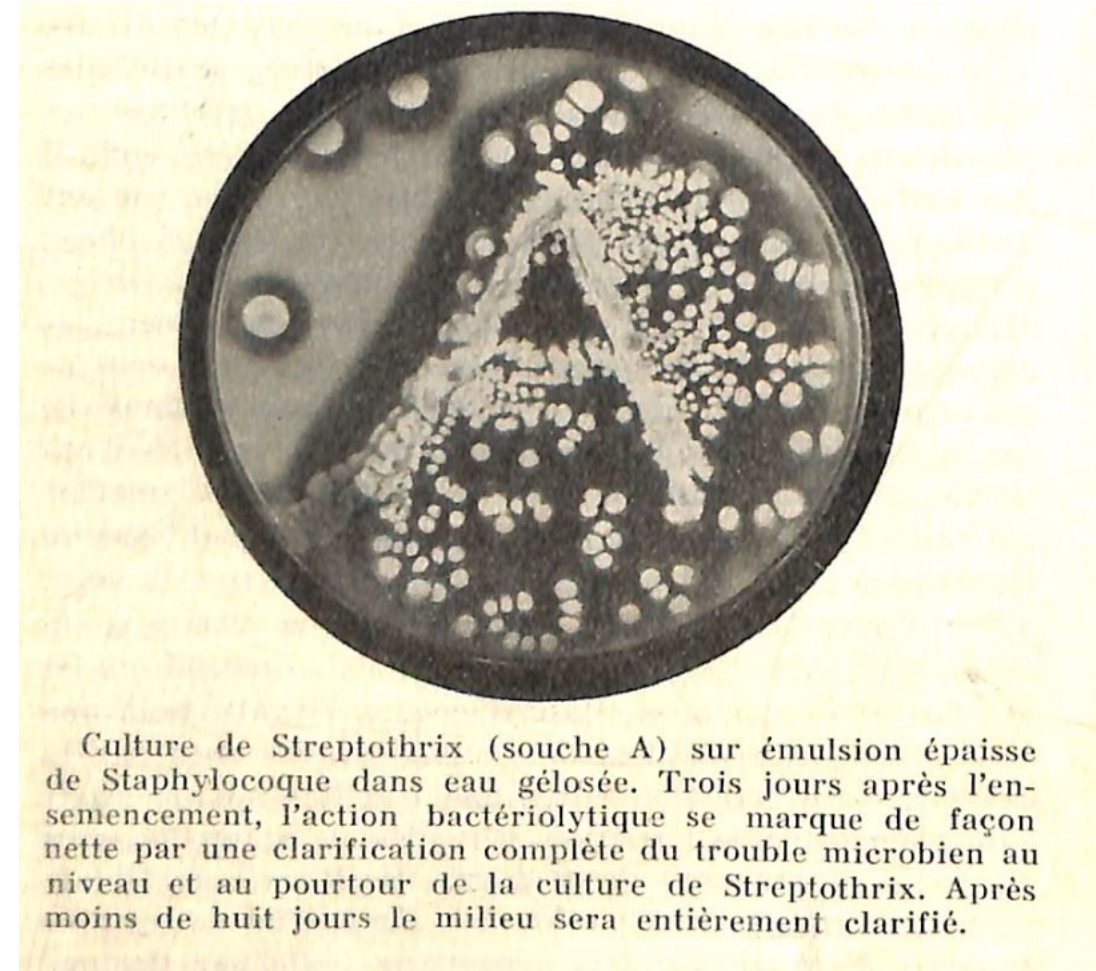


SUR LA « MYCOLYSE », PAR LE *Streptothrix*,
DE DIVERS MICROBES PATHOGÈNES,

par ANDRÉ GRATIA et Mlle J. ALEXANDER.



A l'occasion de recherches sur la bactériophagie, l'un d'entre nous (1) a constaté en collaboration avec S. Dath, que des spores de *Streptothrix* ajoutées à des émulsions très épaisses en eau distillée de divers microbes tels le Staphylocoque, le Vibron du choléra, le Bacille pyocyanique, s'y développaient en provoquant une dissolution complète de ces émulsions, que celles-ci aient été ou non solidifiées par de l'agar-agar.



Culture de *Streptothrix* (souche A) sur émulsion épaisse de Staphylocoque dans eau gélifiée. Trois jours après l'ensemencement, l'action bactériolytique se marque de façon nette par une clarification complète du trouble microbien au niveau et au pourtour de la culture de *Streptothrix*. Après moins de huit jours le milieu sera entièrement clarifié.



Lorsque l'émulsion microbienne est complètement lysée par la moisissure, le « Mycolysat » ainsi obtenu est filtré sur bougie Chamberland. Il est surprenant de voir les quantités considérables de ces mycolysats, notamment celui du vibron cholérique qu'on peut impunément injecter aux animaux. Pourtant les propriétés antigéniques sont restées intactes car les animaux ainsi injectés de mycolysat cholérique fournissent un sérum extrêmement actif.

les. Nous avons aussi obtenu...
Bacille diphtérique et du Bacille de la coqueluche.
Bacille diphtérique et du Bacille de la coqueluche. Nous n'avons obtenu qu'une action
obtenue celle du Gonocoque. Nous n'avons obtenu qu'une action
insignifiante sur les émulsions de B.C.G.

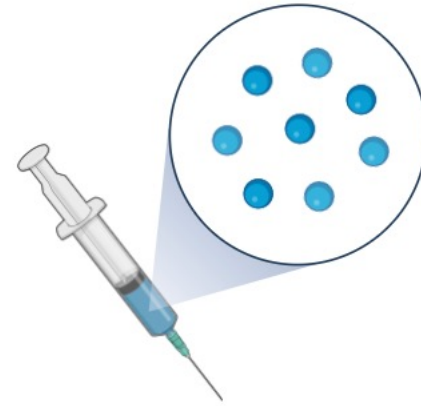
Tous ces mycolysats dont certains comme ceux de la diphtérie
notamment, proviennent de microbes très toxiques, ont pu être
administrés à fortes doses même répétées, pendant longtemps,
au Cobaye et au Lapin sans provoquer d'accidents quelconques.

Nous poursuivons en ce moment, des recherches dans le but
d'étudier la production des anticorps sous l'influence des injections
de ces divers mycolysats. Il est à signaler que, jusqu'à présent,
nous n'avons pu obtenir, par l'injection au Cobaye de mycolysats
du Bacille diphtérique, des sérums neutralisant efficacement
la toxine diphtérique.

(Laboratoire de bactériologie de la Faculté de médecine
de Bruxelles.)

(4) C. R. de la Soc. de biol., 1930, t. 104, p. 1058.
Soc. nat. chirurgie, Paris, 5 mars 1930.

Mycolysate





1040

SOCIÉTÉ BELGE DE BIOLOGIE

SUR UN REMARQUABLE EXEMPLE D'ANTAGONISME
ENTRE DEUX SOUCHES DE COLIBACILLE,

par ANDRÉ GRATIA.

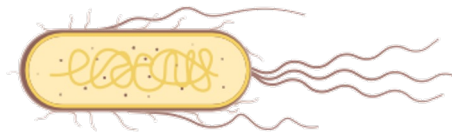
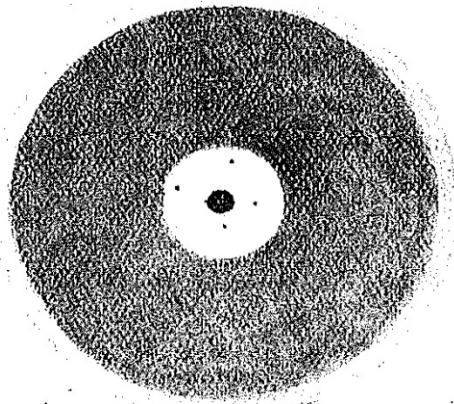


FIG. 3. — EXP. XII. — Culture de *Coli* ϕ sur boîte de Petri, au centre, colonie de *Coli* V, avec zone de diffusion du principe inhibiteur dans laquelle quelques colonies résistantes de *Coli* ϕ .

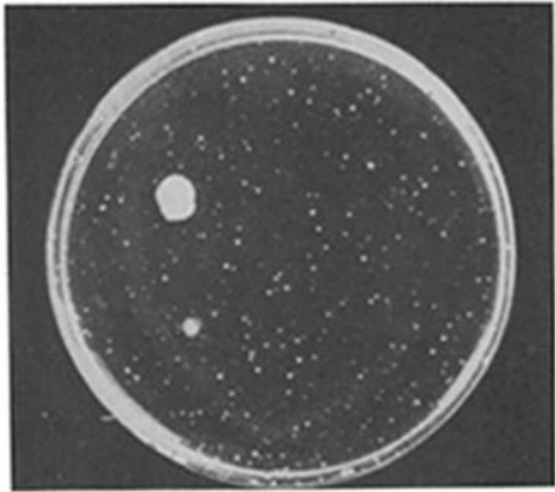


FIG. 2.

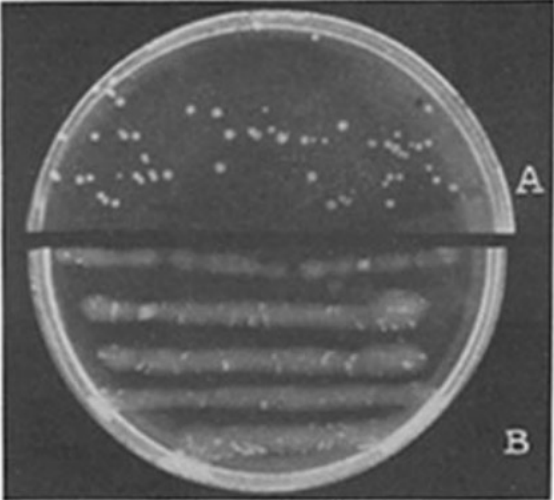


FIG. 3.

FIG. 2. When Experiment 1 is repeated several times, a mucoid colony can occasionally be found. Here is a plate of *coli* O mixed with concentrated lytic agent. Besides the small regular colonies, two large mucoid colonies are visible.

FIG. 3. Plate A. A small round colony of Plate F, Fig. 1, was planted and gave a pure culture of *coli* O R 2. Plate B. The lower mucoid colony seen in Fig. 2 was transplanted and gave a mucoid culture of *coli* O R 1; note the translucent growth studded with opaque spots.

FIG. 4. Plate A. Experiment 10. A loopful of a partially dissolved culture of *coli* M 2 was streaked on an agar plate. In the first streak the growth is very irregular and contains a certain number of mucoid colonies. In the second, the



General Properties of the Different Types.

In the course of our studies on the transmissible autolysis of *Bacillus coli*, we have thus isolated ten different types of organisms, all

TABLE I.

Type.	Resistance.	Motility.	Mucoid growth.	Ability to yield mucoid growth.	Fluorescence.	Seroagglutination.
O	+	0	0	+	++++	0
OR 1	++++	0	++++	0	0	
OR 2	++++	0	0	0	0	
S	+	0	0	0	++	+++
SR	++++	0	0	0	0	+++
R	++	++++	0	0	++	++++
RR	++++	++++	0	0	0	++++
M 1	+++	+++	++++		++++	++++
M 1 a	+	0	0	+	++++	0
M 1 b	++	++++	0	0	++	++++
M 2	+++	+++	0	++++	0	++++

The Invisible Mentor



A pioneer we may not always name—but one whose work we live every day